

Synthèses d'ADN et régénération de l'appareil oral chez *Stentor coeruleus* (Protozoaire cilié hétéotriche)

par

Bernard PELVAT *

Avec 11 figures et 1 tableau

ABSTRACT

DNA synthesis and oral regeneration in *Stentor coeruleus*. — During regeneration of the oral apparatus in *Stentor coeruleus*, two major events take place:

- building of a new oral apparatus
- macronuclear events (cycle of macronuclear condensation and uncoiling)

From numerous studies it appears that regeneration requires RNA and protein synthesis. The role of DNA is unclear.

Cells starved for three days, with a G₁ phase macronucleus, can be induced to synthesize DNA by induction of the regeneration process.

DNA inhibitors block regeneration. The greatest sensibility of *Stentor* to DNA inhibitors takes place at the beginning of the regeneration.

DNA-DNA hybridization between H³ — DNA synthesized during regeneration and cold macronuclear DNA shows that repetitive sequences and some of the unique sequences are preferentially replicated during regeneration.

Labelling of replicated DNA with BuDR and analysis on CsCl gradients followed by hybridization with P³² rRNA shows that rDNA genes are replicated during regeneration. High resolution autoradiography shows that the nucleoli are active in DNA synthesis. Regulation of the regeneration process seems to take place at two levels:

- at the macronuclear level (synthesis of products necessary for the macronucleus cycle)

* Laboratoire de Biologie des Protistes, Département de Biologie animale, Université de Genève, 3, rue de Candolle, 1211 Genève 4.

Poster présenté à l'Assemblée annuelle de la SSZ à Berne. 11 au 12 mars 1983.

— at the primordium level (replication of specific genes).

Some macronuclear genes may replicate during regeneration in response to a repair-induced stimulus.

INTRODUCTION

Stentor coeruleus est un cilié hétérotriche connu pour ses remarquables propriétés morphogénétiques (TARTAR 1961).

La régénération de l'appareil buccal permet l'induction de phases de différenciation cellulaire qui impliquent la formation d'un primordium buccal dans le cortex. La régénération complète prend 8 heures. Elle est accompagnée de modifications de la structure du macronoyau. Les détails morphogénétiques ont été décrits précédemment (PELVAT & DE HALLER 1979; PELVAT & EMERY 1982).

Les structures corticales possèdent une certaine autonomie au cours des processus morphogénétiques mais le macronoyau apparaît comme essentiel pour la régénération chez les ciliés. Chez *Stentor*, sa présence est indispensable pendant les premières heures de la régénération, c'est-à-dire pendant la formation des nouvelles organelles buccales (TARTAR 1961).

Selon TARTAR (1958, 1961, 1963), la cellule est normalement dans un état d'inhibition en ce qui concerne la formation d'un primordium buccal. Cet état se modifie rapidement en un état d'activation lors de l'ablation des structures orales. Cette situation ne peut s'établir que si le macronoyau est présent dans la cellule. DE TERRA (1971, 1978) a montré que le comportement du macronoyau est contrôlé par des signaux d'origine corticale. La régénération nécessite des synthèses d'ARN et de protéines (BURCHILL 1968; PELVAT & DE HALLER 1973, 1983), mais le rôle des synthèses d'ADN reste peu clair. Pendant la morphogenèse, le macronoyau synthétise activement de l'ARN mais aussi de l'ADN. La simultanéité des synthèses d'ADN et d'ARN est bien établie chez les ciliés à macronoyau polygénomique (NILSSON 1976).

Chez *Blepharisma*, un hétérotriche proche de *Stentor*, GAVURIN & HIRSCHFIELD (1974) ont conclu de leurs expériences que la régénération induit une synthèse d'ADN indispensable pour que la régénération se déroule normalement et que le macronoyau puisse accomplir son cycle morphologique.

Chez *S. coeruleus*, une synthèse d'ADN peut être mise en évidence pendant les premiers stades de la régénération.

Dans quelle mesure est-elle en relation avec la régénération de l'appareil oral chez *Stentor coeruleus*?

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Cultures

Stentor coeruleus (souche G) est cultivé en milieu de Carter. Les détails des méthodes ont été décrits précédemment (PELVAT & DE HALLER 1976).

2. Régénération

Les cellules utilisées dans cette étude sont des cellules à jeun depuis 3 jours. FRAZIER (1973) et nos travaux préliminaires (PELVAT & DE HALLER 1981) ont montré que ces cellules sont en phase G₁. Le rejet des structures buccales est provoqué par un traitement à l'urée 4% (TARTAR 1961; PELVAT & DE HALLER 1979). Les détails de la morphogenèse de régénération ont été décrits précédemment (PELVAT & DE HALLER 1979).

3. Inhibiteurs d'ADN utilisés

— *Hydroxyurée* : Cette substance est connue depuis longtemps comme inhibiteur des synthèses d'ADN. C'est un inhibiteur de la phase S (blocage des cellules en phase G_1). L'hydroxyurée agit sur la synthèse de l'ADN en interférant avec la production des précurseurs de l'ADN (au niveau des ribonucléotide réductases).

— *Daunomycine* : Forme un complexe stable avec l'ADN préformé.

— *Cytosine-arabinose* : Inhibe l'ADN polymérase.

4. Microscopie électronique

Les cellules normales ou traitées aux inhibiteurs de synthèse d'ADN ont été fixées au Glutaraldehyde- OsO_4 selon la technique déjà utilisée précédemment (PELVAT & EMERY 1982). Les cellules préparées pour l'autoradiographie ont été fixées de la même façon.

Pour les observations au microscope à balayage, les cellules ont été préparées selon la technique de SMALL & MARZALEK (1969). Les préparations ont été observées sur le microscope à balayage ISI Mini SEM du Museum d'Histoire Naturelle de Genève.

5. Autoradiographie

Les techniques de préparation pour la microscopie optique ont été décrites précédemment (PELVAT *et al.*, 1973).

Pour l'autoradiographie à haute résolution, l'émulsion Ilford L4 a été appliquée sur les grilles selon la technique de GRANDBOULAN (1965) (« dipping »). Les spécimens ont été exposés de 3 semaines à 1 mois à 4° C. Les autoradiographies ont été révélées selon la méthode communiquée par FAKAN (1976) comportant une latensification à l'or. Cette technique permet de localiser avec précision les synthèses d'ADN sous forme de petits grains d'argent.

6. Extraction de l'ADN

L'ADN a été préparé selon la méthode classique de KIRBY légèrement modifiée, comportant une lyse par 2% SDS, 5 mM Tris-HCl, 15 μ g/ml PVS, 5 mM EDTA pH 9 (PELVAT et DE HALLER, 1976).

7. Gradients de Chlorure de Césium

La méthode a été décrite précédemment (PELVAT et DE HALLER, 1976).

8. Hybridation DNA-DNA après séparation des séquences répétitives et uniques sur hydroxylapatite

Les méthodes de séparation des ADN réassociés ou non ont été décrites précédemment (PELVAT & DE HALLER 1976).

Pour les expériences d'hybridation, l'ADN purifié et soniqué à froid est précipité à l'éthanol puis concentré par centrifugation. L'ADN est dissous à nouveau dans du tampon phosphate 0,12 M, dénaturé à 100° C en ampoules scellées et réassocié à 60° C à un Cot correspondant à 40. (Chez *Stentor coeruleus*, souche G, le Cot $\frac{1}{2}$ est égal à 110).

L'ADN partiellement réassocié est chromatographié sur hydroxylapatite pour séparer l'ADN bicaténaire réassocié de l'ADN non réassocié à Cot 40. Les fractions diluées contenant l'ADN sont dénaturées par addition de NaOH 1 M et neutralisées. La concentration du SSC est ajustée à $6 \times \text{SSC}$. La concentration finale de l'ADN est de l'ordre de 20-30 $\mu\text{g/ml}$. L'ADN est déposé sur des filtres de nitrocellulose. Après lavage avec du $6 \times \text{SSC}$ (pH 6.8) les filtres sont séchés à l'air puis 90 minutes sous vide à 80° C. L'ADN issu des expériences de réassociation est de très bas poids moléculaire. Le taux d'ADN retenu par filtre a été déterminé en utilisant de l'ADN- H^3 . L'utilisation de $6 \times \text{SSC}$ à pH légèrement acide (pH 6.8) permet une meilleure rétention (IVANOV & MARKOV 1975). Dans nos expériences, le taux de rétention est de l'ordre de 70-80%.

L'hybridation sur filtre DNA-DNA est pratiquée selon la méthode de DENHARDT avec les modifications de SMITH (1973). Pour éliminer un attachement non spécifique de l'ADN marqué, ajouté pour l'hybridation, les filtres sont prétraités 6 heures par un mélange v/v de 33% formamide — $3 \times \text{SSC}$ et 0,1% BSA. L'hybridation est faite à 37° C en milieu formamide 33% v/v $3 \times \text{SSC}$, ce qui permet d'abaisser la température d'hybridation. Après hybridation, les filtres sont lavés dans du $3 \times \text{SSC}$, séchés et comptés en milieu toluène.

9. Extraction de l'ARN

L'ARN ribosomal a été préparé par une méthode modifiée d'ECKERT *et al.* (1978). Elle comporte une lyse des cellules avec 2% de TPNS, 1% de NaCl, 1mM DTT, en tampon Tris-HCl 0,05 M (pH 7,6), suivie d'une extraction au phénolchloroforme et d'une précipitation de l'ARN à l'éthanol en présence d'acétate 0,1 M pH 5.

10. Hybridation DNA-RNA

Pour hybrider l'ADN collecté des gradients de CsCl, les fractions (100 μl) sont diluées, dénaturées par NaOH et déposées sur filtre. L'hybridation a lieu en milieu $2 \times \text{SSC}$ — 50% formamide à 37° C selon la méthode décrite par Engberg *et al.* (1972) en utilisant du P^{32} rRNA.

RÉSULTATS

1. Initiation de la synthèse d'ADN chez les cellules en régénération

Des cellules à jeun depuis 3 jours (noyau en phase G_1) ont été traitées à l'urée pour rejeter les structures orales et incubées avec de la thymidine- H^3 soit pendant 8 heures (50 $\mu\text{C/ml}$) avec prélèvement d'échantillons chaque heure ou en présence de thymidine- H^3 (75 $\mu\text{C/ml}$) pendant 30 min. à chaque stade de la régénération (« pulse labelling »). Le niveau d'incorporation, bien qu'inférieur à celui des cellules en croissance dans des cultures de routine, peut être considéré comme typique de la régénération et comme le résultat du stimulus créé par le déséquilibre du rapport entre le cortex buccal et somatique et du noyau.

La fig. 1 donne un exemple d'incorporation dans des cellules en régénération. Ces résultats sont en accord avec les travaux de FRAZIER (1973).

Un jeûne plus long (4-5 jours) retarde beaucoup les possibilités d'initiation des synthèses d'ADN qui débutent alors souvent après plus de 12 heures. Dans ce cas, les cellules régénèrent souvent mal ou en plus de 18 heures (épuisement des pools cytoplasmiques?).

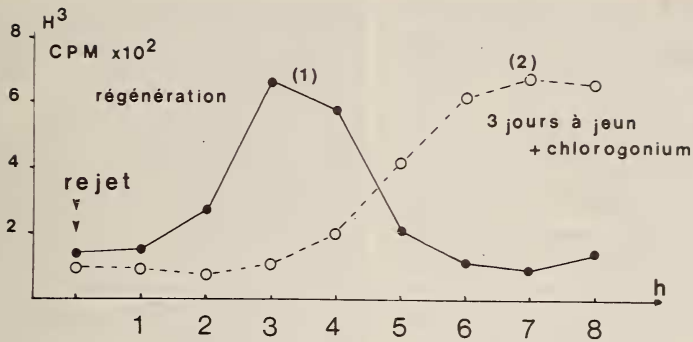


FIG. 1.

Initiation des synthèses d'ADN sur des cellules à jeun.

Courbe (1): synthèses d'ADN dans les cellules en régénération. Courbe (2): initiation des synthèses par apport de nourriture (« nutritional shift up »). Les mesures de l'incorporation sont faites sur des échantillons de 5000 cellules après solubilisation au SDS 1% et précipitation au TCA.

2. Inhibition de la régénération

L'hydroxyurée, une molécule relativement simple, est un inhibiteur connu de la synthèse de l'ADN (SINGER & GELFANT 1972; WORTHINGTON *et al.* 1975). Elle bloque les cellules d'eucaryotes à la limite de la phase G_1 et S.

Dans un travail précédent (PELVAT *et al.* 1973), nous avons montré que des *Stentor* en régénération peuvent supporter des doses très élevées de cette substance, jusqu'à 15 mg/ml (sup. à 100 mM). Une dose de 8-10 mg/ml (environ 100 mM) bloque la régénération, réduit de près de 90% le taux d'incorporation de thymidine- H^3 et provoque souvent une cassure des liaisons entre les nodules du macronoyau (nodules macronucléaires dispersés). La fig. 2 montre l'aspect au microscope à balayage d'un *Stentor* dont la régénération de l'appareil buccal est inhibée par 8 mg/ml d'hydroxyurée. L'observation au microscope électronique du macronoyau (fig. 5 et 6) montre que le noyau des cellules bloquées présente une ultrastructure très voisine de celle des cellules en phase G_1 (1/2 heure après division) (fig. 3, 4). On peut noter toutefois des amas plus importants de chromatine dans les cellules traitées, formant par place une sorte de réseau. Les nucléoles, de taille souvent légèrement plus élevée que dans les cellules en phase G_1 , ont une structure granulaire.

Des résultats pratiquement similaires ont été obtenus avec 2 autres inhibiteurs des synthèses d'ADN: la cytosine-arabinozine (75 μ g/ml) et la daunomycine (50 μ g/ml). (Résultats non présentés)

3. Analyse des types d'ADN synthétisés

L'action des inhibiteurs d'ADN suggère que cet acide nucléique joue un rôle essentiel dans la régénération. Nous avons donc cherché à analyser les types d'ADN synthétisés pendant la régénération et à les relier aux caractéristiques moléculaires du génome

de *S. coeruleus*. Le génome de *Stentor* est plutôt simple, 85% étant formé de séquences non répétitives ou peu répétitives (PELVAT & DE HALLER 1976).

a) **Incorporation relative de thymidine- H^3 dans les séquences uniques et répétitives**

La méthode utilisée dérive de celle décrite par BORKHSENIUS *et al.* (1977) sur *Tetrahymena*.

Des *Stentor* en culture de routine ont été marqués 12 heures en présence de 20 $\mu\text{C}/\text{ml}$ de thymidine- H^3 , laissés ensuite à jeun pendant 3 jours pour que les cellules entrent en phase G_1 et la régénération induite par rejet de la ZMA à l'urée. La régénération a lieu en présence de 15 $\mu\text{C}/\text{ml}$ de thymidine- C^{14} . L'ADN extrait est soniqué, dénaturé et ré-associé à Cot 40 selon « matériel et méthodes ». (Cot $\frac{1}{2}$ de *S. coeruleus* : 110).

A Cot 40, 80% de l'ADN ne s'est pas réassocié et se trouve sous forme monocaténnaire. Le marquage au C^{14} indique les séquences qui se sont répliquées préférentiellement pendant la régénération. Le rapport C^{14}/H^3 est comparé pour les séquences réassociées ou non. De l'ADN est isolé également de *Stentor* (culture de routine) incubés pendant une période équivalente à la régénération simultanément avec de la thymidine H^3 (30 $\mu\text{C}/\text{ml}$) et C^{14} (15 $\mu\text{C}/\text{ml}$). Cet ADN est utilisé comme contrôle.

TABEAU 1.

Rapport de l'incorporation de thymidine - H^3 et C^{14} dans les différents types de séquences du DNA au cours de la régénération (l'activité est donnée en cpm/ μg).

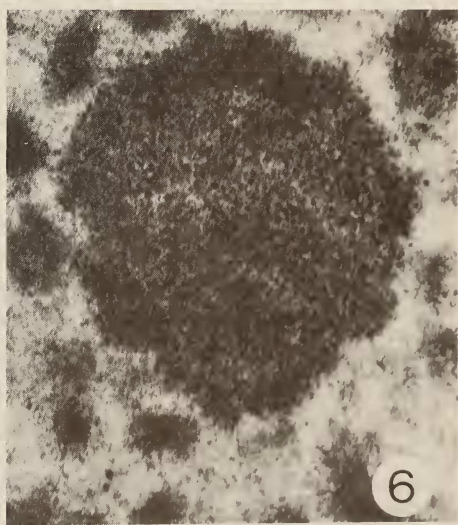
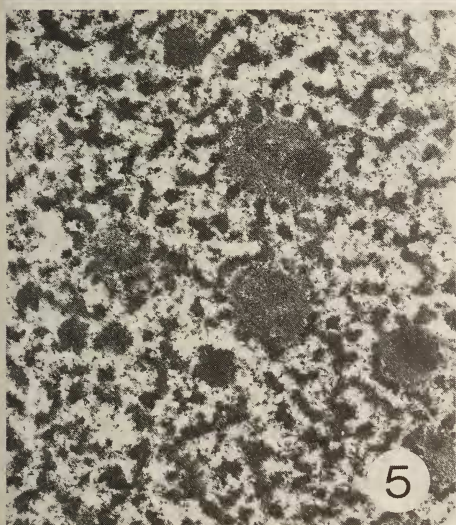
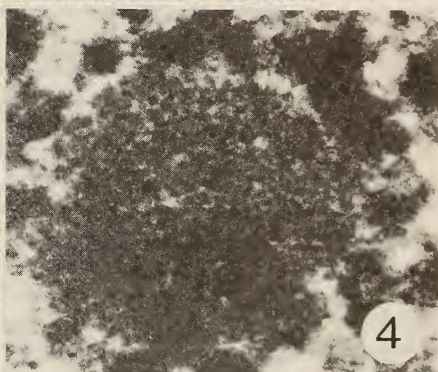
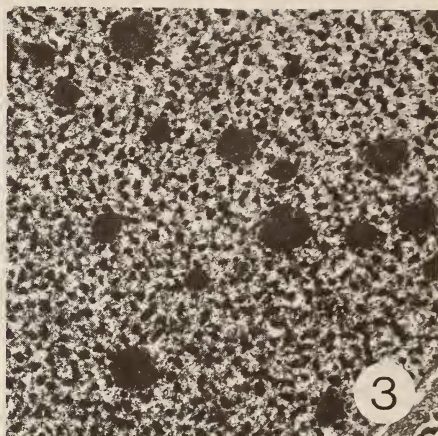
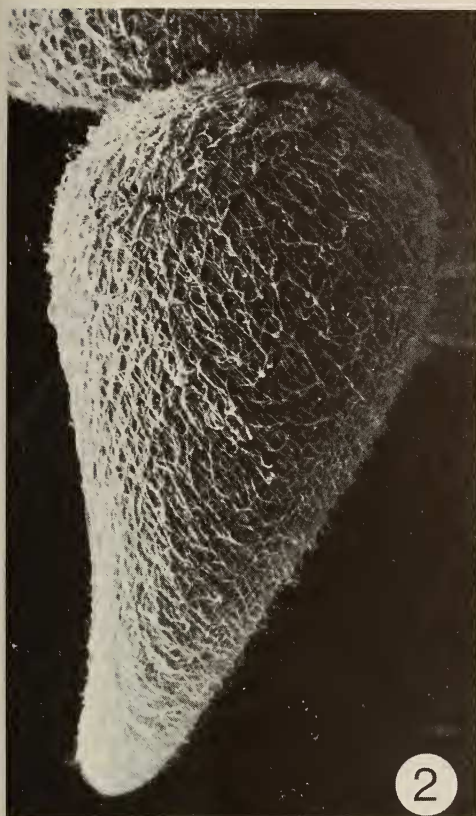
Types de séquences	Cellules en régénération (prémarquage à la thymidine- H^3 , marquage à la thymidine- C^{14})			Cellules en culture de routine (marquage simultané à la thymidine- H^3 et C^{14})		
	C^{14}	H^3	C^{14}/H^3	C^{14}	H^3	C^{14}/H^3
Uniques (Cot sup. 40)	198	3249	0.06	384	4260	0.09
Répétitives (Cot inf. à 40)	162	1209	0.13	147	1521	0.097
Total	378	5107	0.07	552	6390	0.086

Le tableau 1 résume les résultats de cette expérience.

Il apparaît clairement une disjonction des synthèses concernant les cellules en régénération et en culture de routine au niveau de l'incorporation dans les séquences uniques et répétitives.

FIG. 2-6.

FIG. 2: aspect d'une cellule en régénération bloquée par 8 mg/ml d'hydroxyurée. (Pas de formation d'un primordium buccal) (microscope à balayage 500 $\times$); FIG. 3: macronoyau de cellules témoins en phase G_1 (10.000 $\times$); FIG. 4: détail d'un nucléole (cellule en phase G_1) (40.000 $\times$); FIG. 5: ultrastructure du macronoyau de cellules bloquées par 8 mg/ml d'hydroxyurée. Aspect général de la chromatine et des nucléoles (15.000 $\times$); FIG. 6: détail d'un nucléole du macronoyau de cellules traitées par 8 mg/ml d'hydroxyurée (40.000 $\times$).



Les cellules en régénération, incubées en présence de C^{14} -thymidine montrent une proportion de C^{14}/H^3 plus élevée dans les séquences répétitives que dans la partie du génome non réassociée. Ce résultat peut être interprété comme la traduction d'une synthèse préférentielle des séquences de type répétitif. Il nous paraît par contre délicat de parler ici d'« amplification », processus qui impliquerait une réplication multiple des séquences concernées et une différence plus importante de l'incorporation.

L'incorporation de C^{14} dans les séquences uniques indique que la régénération implique également la réplication d'autres catégories de gènes (activation différentielle?).

b) Hybridation sur filtre DNA-DNA des séquences répliquées

L'ADN extrait et réassocié à Cot 40, passé sur hydroxylapatite pour séparer les séquences réassociées est hybridé sur filtre avec de l'ADN marqué à la thymidine- H^3 au cours de la régénération.

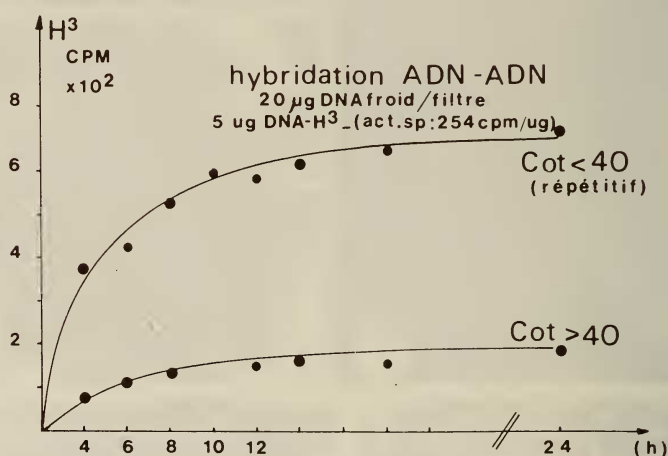


FIG. 7.

Cinétique d'hybridation de l'ADN- H^3 synthétisé pendant la régénération avec les séquences de Cot supérieur et inférieur à 40.

La fig. 7 montre les cinétiques d'hybridation sur filtre DNA-DNA selon la technique décrite dans « matériel et méthodes ». Les filtres contiennent :

- soit de l'ADN réassocié à Cot 40, dénaturé et fixé sur le filtre (séquences répétitives)
- soit de l'ADN non réassocié et fixé sur filtre (séquences uniques).

L'hybridation est faite avec de l'ADN-thymidine H^3 de cellules en régénération (5 µg/ml d'ADN- H^3 à 245 cpm/µg).

Les courbes d'hybridation montrent que la cinétique est très rapide pour les séquences répétitives qui sont préférentiellement concernées.

4. Mise en évidence de la réplication des gènes ribosomaux pendant la régénération

Par leur structure répétitive, les gènes ribosomaux des ciliés étudiés jusqu'ici se retrouvent dans les séquences se réassociant rapidement. En outre, ces gènes à réplication indépendante peuvent être amplifiés, comme c'est le cas chez *Tetrahymena*, au début de la phase S (ANDERSEN 1977). Nous avons cherché à savoir si parmi les ADN se répliquant au cours de la régénération, il était possible de mettre en évidence une réplication des gènes ribosomaux, comme le suggèrent les expériences d'hybridation. Dans une expérience préliminaire (résultats non présentés), nous avons analysé sur gradient de CsCl l'ADN répliqué pendant la régénération après double marquage à la thymidine H³ et C¹⁴. L'hybridation des fractions avec du P³² rRNA ne nous a pas permis de distinguer clairement une synthèse d'un ADN de densité bien différente, ce qui suggère que les types d'ADN synthétisés ont des contenus en GC très proches. Ce résultat est à mettre en rapport avec l'homogénéité de l'ADN analysé sur gradient de CsCl par centrifugation analytique (fig. 8a et PELVAT & DE HALLER 1976). Nous avons donc eu recours à l'utilisation de BUDR pour alourdir l'ADN répliqué selon la technique utilisée par ANDERSEN *et al.* (1970), LYKKESFELDT & ANDERSEN (1974).

L'usage de BUDR permet de séparer l'ADN nouvellement répliqué par intégration de cet analogue de la thymidine. Les concentrations en BUDR sont faibles pour ne pas interférer avec le processus morphogénétique.

LYKKESFELDT & ANDERSEN (1974) ont montré que le haut degré de polyploïdie du macronoyau des ciliés permet l'utilisation de BUDR sans effets négatifs mesurables. Chez *Stentor coeruleus*, les cellules en régénération supportent des concentrations de 5 mM sans perturbations macronucléaires notables mais la régénération est retardée. Des concentrations de 10-50 mM bloquent la régénération et provoquent parfois des altérations de la structure du macronoyau (fragmentation, ramifications). Les concentrations tolérées par *S. coeruleus* sont très élevées; chez *Blepharisma*, un hétéotriche proche de *Stentor*, GAVURIN & HIRSCHFELD (1974) ont montré que des concentrations inférieures à 1 mM de BUDR produisent déjà une proportion élevée de cellules à régénération anormale.

Pour suivre la réplication du DNA au cours de la régénération, des *Stentor* ont été marqués à la thymidine-H³ pendant 24 h. (cultures de routine), laissés à jeun 3 jours puis la régénération a été induite en présence de BUDR. Pour l'utilisation de BUDR comme marqueur de densité, les cellules en régénération sont traitées par une concentration de 0,1-0,3 mM de BUDR, laissé dans le milieu pendant le temps de la régénération.

L'ADN est isolé, mis sur gradient de CsCl et les fractions analysées (détermination de l'indice de réfraction, de la radioactivité des fractions, hybridation avec le rRNA).

L'utilisation de BUDR montre que l'ADN synthétisé pendant la phase S de la régénération a une densité plus élevée par incorporation de BUDR et a dérivé dans une position que l'on peut considérer comme hybride. Il ne nous a pas été possible de distinguer un pic de densité encore plus élevée nous permettant d'affirmer qu'une partie importante s'est répliquée plusieurs fois (amplification). Si c'est le cas, l'ADN qui s'est répliqué plusieurs fois ne représente qu'un pourcentage très faible. Nous pouvons constater, d'après la position des pics marqués au tritium qu'une partie de l'ADN synthétisé n'a pas glissé, ce qui indique que tout l'ADN du macronoyau ne s'est pas répliqué pendant la régénération, processus qui par certains aspects rappelle beaucoup la morphogénèse de division. Il n'est cependant pas possible d'exclure qu'une partie de l'ADN qui s'est répliqué pendant la régénération a utilisé le pool de thymidine (marqué ou non) présent dans la cellule.

ANDERSEN *et al.* (1970) et ENGBERG *et al.* (1972) ont montré que la BUDR s'incorpore préférentiellement dans les gènes ribosomaux en réplication.

On sait en outre que le BUDR s'incorpore de façon prédominante dans les séquences répétitives (SCHWARTZ & KIRSTEN 1974).

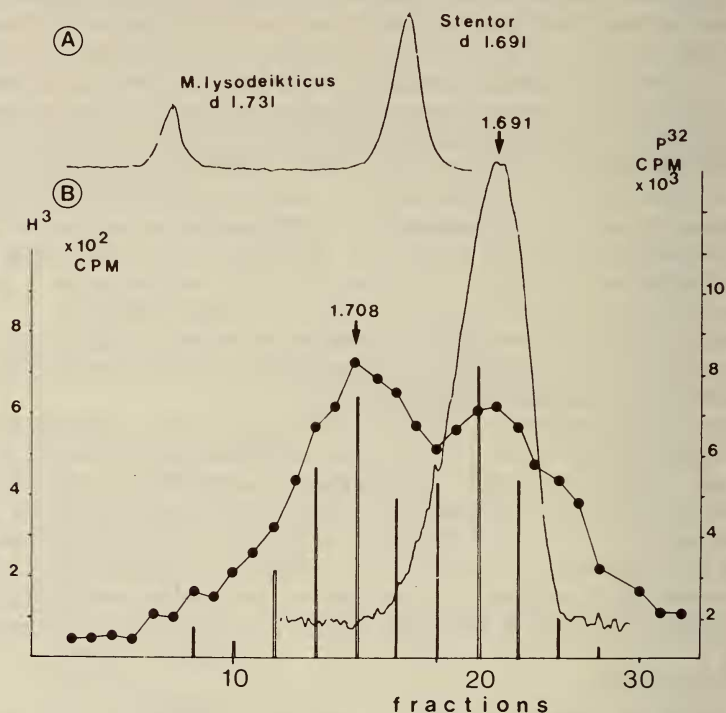


FIG. 8.

a) profil de densité de l'ADN du macronoyau de *Stentor coeruleus* analysé sur gradient de CsCl (centrifugation analytique).

b) analyse de l'ADN répliqué pendant la régénération avec traitement au BuDR (gradient de CsCl). Les cellules prémarquées à la thymidine -H³ ont régénéré en présence de BuDR. La courbe du marquage présente 2 pics dont l'un, de densité 1.708 correspond à l'ADN hybride, synthétisé pendant la régénération. Les traits verticaux représentent le rRNA -P³² hybridé avec les fractions du gradient. De l'ADN non radioactif a été utilisé comme marqueur pour déterminer la migration normale dans le gradient de CsCl d'ADN de *Stentor*.

Dans nos expériences, les fractions qui s'hybrident le mieux avec du rRNA sont celles qui ont incorporé le BUDR, indication d'une réplication importante des gènes ribosomaux. L'hybridation entre l'ARN ribosomal et l'ADN dans la région de l'ADN qui ne s'est pas répliqué peut être attribuée aux gènes ribosomaux préexistants dans le macronoyau et donc non substitués. Nous pouvons donc en conclure que ce n'est qu'une partie des gènes ribosomaux qui est répliquée pendant la régénération. Une

estimation quantitative du nombre de gènes ribosomaux présents dans la cellule n'a pas été possible par la méthode utilisée.

5. Visualisation des synthèses par autoradiographie au microscope électronique

En microscopie optique, les cellules en régénération présentent un marquage important des noyaux (fig. 9 et PELVAT *et al.* 1973) mais la localisation du marquage est imprécise. Pour caractériser cytologiquement le marquage de l'ADN à la thymidine- H^3 au cours de la régénération, des autoradiographies à haute résolution selon la technique décrite par FAKAN (1976) ont été effectuées.

Le marquage du macronoyau est surtout important pendant les premiers stades de la régénération. Pendant le cycle de réorganisation du macronoyau en fin de régénération, l'incorporation de thymidine- H^3 est pratiquement nulle (PELVAT & EMERY 1982).

Les cellules ont été marquées par un « pulse » de 20 min. à la thymidine- H^3 (100 $\mu\text{C}/\text{ml}$) au stade 3 de la régénération (période de synthèse active). Sur des coupes à faible grossissement, nous avons pu estimer que le $1/3$ environ du marquage total est localisé dans les nucléoles.

Aux forts grossissements (fig. 10 et 11), nous avons pu déterminer que la thymidine- H^3 est incorporée dans le macronoyau :

— au voisinage de la chromatine condensée, généralement à la limite des amas denses et sur la chromatine proche des nucléoles (chromatine périnucléolaire). Les études récentes (FAKAN 1978) ont montré que la bordure de la chromatine condensée, du moins chez les eucaryotes diploïdes, correspond à la chromatine active.

— au niveau des nucléoles dans la partie fibrillaire ou à proximité, site de localisation des gènes ribosomaux si l'on se réfère à ce que l'on connaît chez les autres ciliés et eucaryotes inférieurs (ENGBERG *et al.* 1974; RYSER *et al.* 1973).

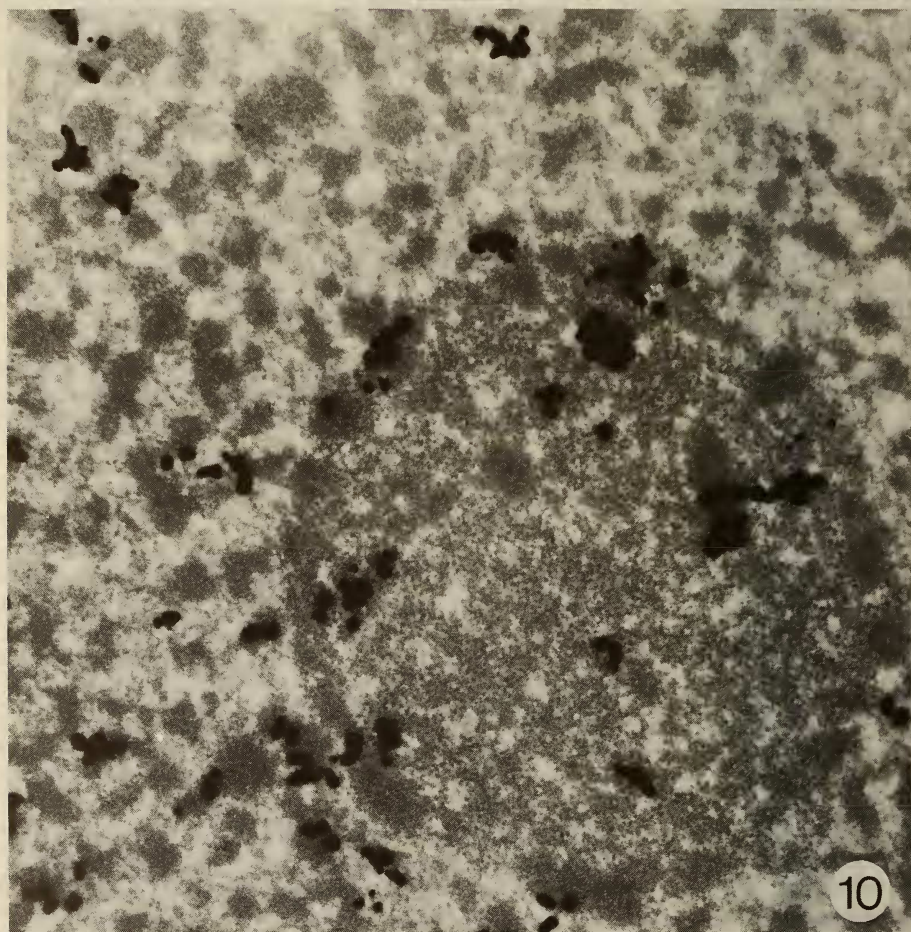
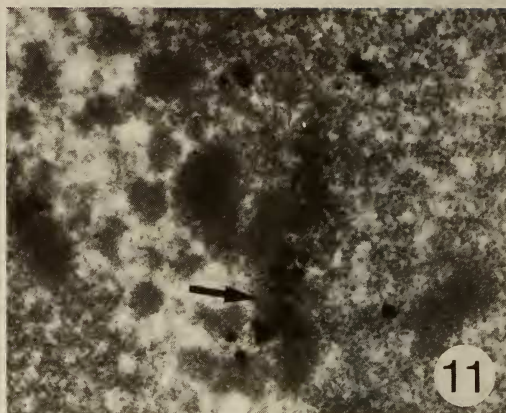
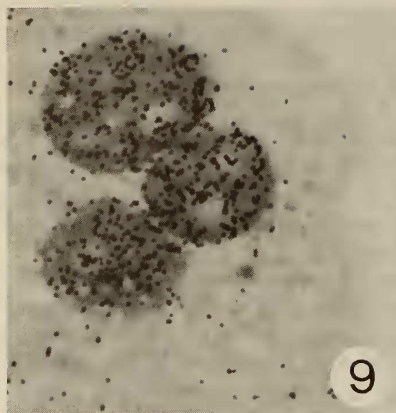
L'autoradiographie confirme les expériences d'hybridation. Elle montre que la régénération induit la réplication de types spécifiques d'ADN cellulaires et qu'une partie de l'ADN répliqué au cours de la régénération correspond à l'ADN nucléolaire (gènes ribosomaux).

DISCUSSION

L'implication directe des synthèses d'ADN dans la régénération est démontrée par l'action des inhibiteurs de synthèses d'ADN: hydroxyurée (PELVAT *et al.* 1973), daunomycine (BANERGEE *et al.* 1971 et ce travail), BuDR à haute dose chez *Blepharisma* (GAVURIN & HIRSCHFELD 1974); bien qu'il ne soit pas toujours aisé de tenir compte des effets indirects de ces substances. La phase de la régénération sensible aux inhibiteurs correspond à la période pendant laquelle ont lieu les synthèses.

Les similitudes morphologiques entre division et régénération suggèrent que ces 2 processus doivent avoir des traits communs, bien que dans le cas de la régénération, la reconstitution de l'appareil oral soit provoquée sur une cellule qui n'est normalement pas dans une situation de production d'un nouvel appareil buccal. Le fait que le macronoyau de cellules en régénération passe par un cycle de condensation-élongation-renodulation, alors que la cellule ne se divise pas, plaide également en faveur de cette conception.

DE TERRA (1971) a montré que chez *S. coeruleus*, le cortex exerce un contrôle sur l'activité nucléaire. Le rapport déterminant est l'équilibre entre le cortex buccal et soma-



tique. Une modification de ce rapport conduit à une activation ou une inhibition des synthèses d'ADN.

On connaît de nombreux exemples où la taille ou le taux de protéines exerce un contrôle sur les synthèses d'ADN. La réplication de l'ADN est initiée au moment où le rapport entre la masse cellulaire (taille ou contenu en protéines) et le génome atteint une valeur critique. Chez *Paramecium* (BERGER 1978), *Tetrahymena* (SEYFERT & CLEFFMANN 1982) ou encore chez les levures (NURSE & THURIAUX 1977) parmi les eucaryotes inférieurs.

Nous pensons que dans le cas d'une cellule en régénération, l'ablation des structures buccales doit créer un déséquilibre que le turn-over ne suffit pas à compenser. Le système est alors mis en éveil, comme pour une division. Il y a stimulation des synthèses mais à un niveau moindre. Si une différence quantitative est aisément détectable (PELVAT *et al.* 1973), il n'en est pas de même de différences qualitatives potentielles.

La régulation de la régénération se fait probablement à plusieurs niveaux:

a) gènes ribosomaux

Les gènes ribosomaux des eucaryotes inférieurs étudiés jusqu'ici existent sous forme de copies extrachromosomiques.

Une réplication de ces gènes au cours de la régénération n'a rien de surprenant.

Elle est une réponse fréquente chez les ciliés à une perturbation du métabolisme cellulaire. Chez *Tetrahymena*, ENGBERT *et al.* (1972) estiment qu'à la suite d'un choc nutritif (« nutritional shift up ») l'induction de la réplication ne peut être considérée comme une amplification. Cette augmentation ne correspond probablement pas à un besoin accru en rRNA transcrit. Le changement de milieu conduit en quelque sorte à une « fausse initiation » de la réplication, comme le notent ENGBERT *et al.* (1972).

Pour BORKHESENIUS *et al.* (1977) au contraire, ces « extraréplications » ont une signification biologique. Elles peuvent être observées même dans des conditions de culture normale et sont utilisées pour la régulation des biosynthèses. Chez *Saccharomyces*, SINGER & JOHNSTON (1982) ont pu montrer qu'une synthèse de pré-rib RNA est un facteur de régulation et d'initiation de la phase S. Une réplication des gènes ribosomaux peut conduire à une augmentation de ces précurseurs du rRNA nécessaires à la formation de nouveaux ribosomes. Chez *Stentor*, nous avons pu montrer que la BuDR inhibiteur de la maturation du pré-rib RNA retarde la régénération et provoque, entre autre, une fragmentation du macronoyau (résultats non publiés).

b) formation du prémordium buccal

L'action des inhibiteurs d'ADN montre que ces substances interfèrent avec le processus morphologique lui-même et que l'inhibition doit probablement affecter de nombreux gènes. Toutefois, KACZANOWSKI (1975) a pu montrer que chez *Tetrahymena pyriformis* syngen 1, souche D, l'arrangement des membranelles du champ buccal est sous le contrôle d'un seul gène (gène mp). Au cours du processus de régénération, on

FIG. 9-11.

FIG. 9: autoradiographie au microscope optique de macronoyau de cellules en régénération (stade 3); FIG. 10 et 11: autoradiographie au microscope électronique de macronoyaux en régénération (stade 3). Localisation du marquage au niveau de la partie fibrillaire des nucléoles. La figure 11 montre un détail d'un nucléole (gross. 40.000 ×).

peut imaginer que la réplication de gènes spécifiques produise des copies additionnelles pour une synthèse de protéines (ou enzymes) bien qu'il soit certain que la majeure partie du mRNA soit produit sur un ADN déjà présent. GAVURIN & HIRSCHFIELD (1974) ont émis l'hypothèse que des gènes du macronoyau peuvent se répliquer pendant la régénération, soit en réponse à un stimulus induisant des systèmes de réparation (« repair induced system »), soit pour l'amplification différentielle de gènes sélectifs, correspondant à une demande accrue de la cellule en protéines ou en systèmes de régulation. La régénération serait alors qualitativement différente de la division au niveau des synthèses. CAHN *et al.* (1968) ont montré que la réplication sélective de parties du génome est un mécanisme utilisé par les cellules pour atteindre et maintenir un état différencié. Une réplication différentielle des gènes a été également mise en évidence chez les eucaryotes sup. par AGEKOKE & TAYLOR (1977).

c) organisation du macronoyau

Le blocage des cellules en phase G_1 par l'hydroxyurée et les aberrations dans l'organisation du macronoyau après traitement par des doses importantes de BuDR (fragmentation, ramifications...) suggèrent que les synthèses d'ADN doivent jouer un rôle au niveau du macronoyau: (cycle macronucléaire et réorganisation de la chromatine).

Les synthèses d'ADN ne peuvent avoir lieu qu'en début de régénération, le macronoyau ne synthétisant pas d'ADN pendant sa réorganisation (PELVAT & EMERY 1982). Pour GIESE (1970), un type d'ADN « spécial » est nécessaire pour que le macronoyau complète son cycle. Un tel ADN nous semble difficile à mettre en évidence, dans l'état de nos connaissances. GAVURIN & HIRSCHFIELD (1974) concluent de leurs études sur la régénération chez *Blepharisma* que les synthèses d'ADN sont associées à la réorganisation de la chromatine avec des conséquences sur la phase d'élongation du macronoyau en fin de régénération. Il est aussi possible que la régulation se fasse au niveau des histones. GROPPI & COFFINO (1980) ont en effet montré que l'ADN synthétisé pendant la phase S apparaît comme nécessaire pour stabiliser les nouvelles histones synthétisées.

RÉSUMÉ

La régénération de l'appareil oral de *Stentor coeruleus* est un système permettant une induction de la ciliogenèse buccale. Elle est accompagnée de modifications structurales et ultrastructurales du macronoyau. Le rôle de l'ADN dans ce processus est mal connu.

Des cellules à jeûn depuis 3 jours, avec un macronoyau en phase G_1 peuvent être induites à synthétiser de l'ADN par provocation de la régénération.

Les inhibiteurs des synthèses d'ADN bloquent la régénération.

Les *Stentor* sont surtout sensibles aux inhibiteurs au début de la régénération, période pendant laquelle ont lieu les synthèses d'ADN. L'hybridation DNA-DNA montre que les séquences qui se répliquent au cours de la régénération sont surtout de type répétitif. Le marquage de l'ADN en réplication avec du BuDR et analyse sur gradient de CsCl suivie d'hybridation avec du P^{32} rRNA montre que les gènes ribosomaux se répliquent pendant la régénération. L'autoradiographie à haute résolution a confirmé ces analyses à caractère biochimique.

La régulation de la régénération semble se faire à 2 niveaux:

- au niveau de la formation du primordium (début de la régénération)
- au niveau du cycle du macronoyau en fin de régénération.

Ces synthèses doivent être considérées comme le reflet de la mise en éveil par la régénération, de systèmes nécessaires pour la reformation de l'appareil oral, structure essentielle de la cellule, et pour le contrôle du cycle du macronoyau.

REMERCIEMENTS

Je remercie R. Emery de son assistance pour les travaux de microscopie électronique, M^{me} J. Fakan du CME de l'Université de Lausanne et M^{me} T. Ton-That du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Genève pour leur aide et leurs conseils pour la préparation des autoradiographies au microscope électronique. Je remercie le Prof. G. de Haller, le Dr M. Ojha et J. D. Hufschmid qui ont accepté de relire le manuscrit.

La photo au microscope à balayage a été prise sur le SEM du Museum d'Histoire Naturelle de Genève par J. Wüest.

Ce travail a été soutenu par le FN. N° 3657.0.80. attribué au Professeur G. de Haller.

BIBLIOGRAPHIE

- ADEGOKE, J. A. and J. H. TAYLOR. 1977. Sequence programming of DNA replication over the S phase of Chinese hamster cells. *Expt. Cell. Res.* 104 (1): 47-54.
- ANDERSEN, H. A. 1977. Replication and functions of macronuclear DNA in synchronously growing population of *Tetrahymena pyriformis*. *Carlsberg Res. Comm.* 42: 225-248.
- ANDERSEN, H. A., C. F. BRUNK and E. ZEUTHEN. 1970. Studies on the DNA replication in heat synchronized *Tetrahymena pyriformis*. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* 38: 123-131.
- BANERJEE, S. and L. MARGULIS. 1971. Inhibition of cilia regeneration by antineoplastic agents. *Cancer Chem. Reports* 55: 531-537.
- BERGER, J. D. 1978. Downward regulation of macronuclear DNA content in *Paramecium tetraurelia*. Effect of excess DNA on subsequent DNA and protein content and the cell growth rate. *Expt. Cell Res.* 114: 253-261.
- BORKHSENIUS, S. N., A. BELOZERSKAYA, N. A. MERKULOVA, I. S. IRLINA and V. I. VOROB'EV. 1977. Possible repeated replication of part of the nuclear DNA of *Tetrahymena* during a single S phase. *Mol. Biol. (URSS)* 11/1: 134-141.
- BURCHILL, B. B. 1968. Synthesis of RNA and protein in relation to oral regeneration in the ciliate *Stentor coerulens*. *J. exp. Zool.* 167: 427-438.
- CAHN, R. D., M. SOLURSH and R. LASHER. 1968. Selective gene amplification as a mechanism for stability of specialized cellular differentiation. *J. Cell Biol.* 39. 20a.
- DE TERRA, N. 1971. Evidence for cortical control of macronuclear behaviour in *Stentor*. *J. Cell Physiol.* 78: 377-386.
- 1978. Some regulatory interactions between cell structure at the supramolecular level. *Biol. Rev.* 53: 427-463.
- ECKERT, W. A., W. KAFFENBERGER, G. KROHNE and W. W. FRANKE. 1978. Introduction of hidden breaks during r RNA maturation and ageing in *Tetrahymena pyriformis*. *Eur. J. Biochem.* 87: 607-616.
- ENGBERG, J., D. MOWAT and R. E. PEARLMAN. 1972. Preferential replication of the ribosomal RNA genes during a nutritional shift-up in *Tetrahymena pyriformis*. *Bioch. Bioph. Acta.* 272: 312-320.

- ENGBERG, J., G. CHRISTIANSEN and V. LEICK. 1974. Autonomous rDNA molecules containing single copies of the ribosomal RNA genes in the macronucleus of *Tetrahymena*. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 59 (4): 1356-1365.
- FAKAN, S. 1976. High resolution autoradiography as a tool for the localization of nucleic acid synthesis and distribution in the mammalian cell nucleus. *J. Microscopy* 106. (2): 159-171.
- 1978. High resolution autoradiographical studies on chromatin functions. In: "The Cell nucleus". Vol. 5. H. BUSCH Ed. *Acad. Press.* 353.
- FRAZIER, E. 1973. DNA synthesis following gross alteration of the nucleo-cytoplasmic ratio in the ciliate *Stentor coeruleus*. *Devl Biol.* 34: 77-92.
- GAVURIN, L. and H. HIRSCHFIELD. 1974. Synthesis and inhibition of macronuclear DNA in regenerating *Blepharisma*. *J. exp. Zool.* 187: 387-404.
- GIESE, A. 1970. Macronuclear synthesis during regeneration in *Blepharisma* determined by specific inhibitors and incorporation of C^{14} - tracers. *Expt. Cell Res.* 61: 91-102.
- GROPPI, V. E. and P. COFFINO. 1980. G_1 and S phase mammalian cells synthesized histones at equivalent rate. *Cell* 21. 195-204.
- IVANOV, I. G. and G. C. MARKOV. 1975. RNA- DNA hybridization on membrane filters with fragmented mammalian DNA. *Biochem. biophys. Acta.* 383: 123-130.
- KACZANOWSKI, A. 1976. An analysis of "mp" gene affected morphogenesis in *Tetrahymena pyriformis* syngen 1 (species 1) ciliates. *J. exp. Zool.* 196: 215-230.
- LYKKESFELDT, A. E. and H. A. ANDERSEN, 1974. The effect of 5-BuDR on DNA replication and cell division in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* 62: 316-21.
- NILSSON, J. R. 1976. Physiological and structural studies on *Tetrahymena pyriformis* GL. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg.* 40 (18-19): 215-355.
- NURSE, P. and P. THURIAUX. 1977. Control over the timing of DNA replication during the cell cycle of fission yeast. *Expt. Cell Res.* 107: 365-377.
- PELVAT, B. and G. DE HALLER. 1976. Macronuclear DNA in *Stentor coeruleus*. A first approach to its characterization. *Genet. Res.* 26: 277-289.
- PELVAT B. et G. DE HALLER. 1979. La régénération de l'appareil oral chez *Stentor coeruleus*. Etude au protargol et essai de morphogénèse comparée. *Protistologica* 15 (3): 369-386.
- PELVAT, B. and G. DE HALLER. 1981. Molecular aspects of oral regeneration in the heterotrich ciliate *Stentor coeruleus*. IX. *Congr. Int. Soc. Dev. Biol. (Bâle)* : 149.
- PELVAT B. et G. DE HALLER. 1983. Etude des protéines synthétisées au cours de la régénération de la ZMA chez *Stentor coeruleus*. *Archiv Protistenk.* (sous presse)
- PELVAT, B. et R. EMERY. 1982. La régénération de l'appareil oral chez *Stentor coeruleus*. II. Modifications de l'ultrastructure du macronoyau. *Protistologica* 18 (3): 371-387.
- PELVAT, B., N. HYVERT et G. DE HALLER. 1973. Synthèses d'acides nucléiques dans le macronoyau de *Stentor coeruleus*. Régénération et cycle de division. *Protistologica* 9 (2): 255-267.
- RYSER, U., S. FAKAN and R. BRAUN. 1973. Localization of ribosomal RNA genes by high resolution autoradiography. *Expt. Cell Res.* 78: 89-97.
- SCHWARTZ, A. and J. KIRSTEN. 1974. Distribution of 5-BuDR in the DNA of rat embryo cells. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 71: 3570.
- SEYFERT, H. M. and G. CLEFFMANN. 1982. Mean macronuclear DNA contents are variable in the ciliate *Tetrahymena*. *J. Cell. Sci.* 58: 211-223.
- SINGER, R. M. and S. GELFANT. 1972. Continuous inhibition of DNA synthesis in mouse ear epidermis using hydroxyurea. *Expt. Cell Res.* 73: 270-71.
- SINGER, R. A. and G. C. JOHNSTON. 1982. Cell cycle regulation in the yeast. In: Genetic expression in the Cell cycle. Padilla & McCarthy Edit. *Acad. Press.* : 181-198.

- SMALL, E. B. and D. S. MARSZALEK. 1969. Scanning Electron Microscopy of fixed, frozen and dried protozoa. *Science* 163: 1064-1065.
- SMITH, D. W. 1973. DNA-DNA hybridization with emphasis on filter techniques. IN: Molecular techniques and approaches in Developmental Biology. M. CHRISPEELS Ed., *Wiley Interscience Publ.*
- TARTAR, V. 1958. Induced resorption of oral primordium in regenerating *Stentor coeruleus*. *J. exp. Zool.* 139: 1-32.
- 1961. The Biology of *Stentor*. Pergamon Press. Ed.
- 1963. Extreme alteration of the nucleocytoplasmic ratio in *Stentor*. *J. Protozool.* 10 (4): 445-461.
- WORTHINGTON, D. U., D. S. NACHTWAY and E. B. WAGENAAR. 1975. Hydroxyurea: morphological effects on the macronucleus of *Tetrahymena*. *Expt. Cell Res.* 92: 435-443.
-